

· 论 著 ·

宫颈癌中 Eag1 钾离子通道的表达以及缺氧对其的调控作用*

林 爽, 李 力[△], 易 萍, 郑秀惠, 郭建新, 韩 健

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科, 重庆 400042)

摘要:目的 研究不同病变宫颈组织中 Eag1 表达情况以及缺氧对宫颈癌 Hela 细胞膜上 Eag1 钾离子通道表达的影响。方法 采用免疫组化、免疫荧光和 RT-PCR 法, 检测不同病变宫颈组织和宫颈癌 Hela 细胞中 Eag1 蛋白的表达情况, 以及不同缺氧时间和缺氧浓度对 Hela 细胞中 Eag1 mRNA 表达的影响。结果 免疫组化结果表明, 宫颈上皮内瘤变组织中 Eag1 蛋白的表达明显高于正常组, 宫颈癌组织中 Eag1 的表达明显高于宫颈上皮内瘤变组; Eag1 的表达随临床分期的增高而增加; 与病理分级无明显相关性。免疫荧光、RT-PCR 结果表明, 正常培养的宫颈癌 Hela 细胞中即有 Eag1 表达; 其表达随缺氧程度加深及缺氧时间的延长明显增强。结论 Eag1 钾离子通道蛋白有可能成为新的早期筛查和判断宫颈癌生物学行为的诊断指标。Eag1 在宫颈癌 Hela 细胞缺氧感受中起重要的作用。

关键词: 宫颈癌; 钾离子通道; Eag1

中图分类号: R737.33; R730.43

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)08-0899-03

Expression of Eag1 K⁺ channel in cancer of the cervix and the regulation of hypoxia*

LIN Shuang, LI Li[△], YI Ping, et al.

(Department of Obstetrics and Gynecology, Daping Hospital, the Third Military University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective Immunohistochemistry was employed to detect the expression of Eag1 protein in different cervix uteri tissues and CACX Hela cells. **Methods** We determined the effects of different hypoxia time and hypoxic concentration on the expression of Eag1 mRNA in Hela cell by using RT-PCR. **Results** The expression of Eag1 protein in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) tissue was significantly higher than that in normal control group, and the expression in CACX tissue was remarkably higher than that in CIN group. The expression of Eag1 ascended as the development of clinical stage of cervical cancer, but almost irrelevant to pathological grade. Results of immunofluorescence and RT-PCR suggested that the expression of Eag1 significantly increased along with the aggravation of hypoxic degree and prolong of hypoxia time. **Conclusion** Eag1 K⁺ channel protein is possible to become diadynamic criteria for new early screening and CACX biological behavioral judgment. Meanwhile, Eag1 plays an important role in hypoxic reception of CACX Hela cell.

Key words: cervical cancer; potassium channels; Ether \bar{a} -go-go

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤, 虽然目前诊疗技术有了较大的提高, 但仍有 30%~40% 的患者死于局部复发和远处转移。最近有关离子通道与低氧适应之间的关系引起了越来越多的注意^[1]。有研究认为膜 Eag1 钾离子通道宫颈癌的相关性最为密切^[2]。但目前 Eag1 在宫颈癌组织中的表达情况仍需进一步证实。本研究以不同病变宫颈组织和体外培养的人宫颈癌 Hela 细胞为研究对象, 通过研究 Eag1 钾离子通道在宫颈癌发生、发展过程中的表达情况以及缺氧对 Eag1 钾离子通道表达的影响, 以期对宫颈癌的诊治提供新的途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本全部来自本院妇产科 1995 年 12 月至 2008 年 12 月诊治的病例, 全部标本均经本院病理科诊断并证实。选取慢性宫颈炎 20 例, 宫颈上皮内瘤变(CIN)40 例(CIN I 15 例, CIN II 10 例, CIN III 15 例), 宫颈鳞癌 80 例, 共计 140 例。患者年龄 24~77 岁, 平均 46 岁。

1.2 细胞缺氧模型的准备 观察细胞 70%~90% 融合, 细胞贴壁形态良好。在无菌条件下弃去大部分培养液, 剩余培养基

仅可将细胞覆盖, 以减少气体弥散距离。将各组细胞同时置于密闭容器, 将混合气体(含 90% N₂、5% CO₂、5% O₂)以 10 L/min 流量充入密闭容器, 持续 20 min, 同时关闭进气口和出气口, 抽取气体经血气分析仪检测容器内 O₂ 浓度小于 5%。

1.3 Eag1 表达的检测

1.3.1 免疫组化检测方法 兔抗人 Eag1 单克隆抗体购自 sigma 公司。组织标本常规石蜡包埋, 制成 4 μ m 厚切片, 常规脱蜡, 30% 新鲜双氧水灭活内源酶, 将切片浸入 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉加热至沸后断电, 间隔 10 min 重复 2 次, 冷却后 0.02 M PBS 洗涤, 抗原修复液修复抗原, 山羊血清封闭后不洗, 滴加 1:150 稀释的 Eag1 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 0.02 M PBS 洗后加生物素标记羊抗兔二抗, 30 $^{\circ}$ C 染色 20 min 后, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 二甲苯透明, 封片。显微镜下观察并计数阳性染色细胞数。

1.3.2 免疫荧光检测方法 对数生长期的 Hela 细胞接种于装有载玻片的无菌培养皿中, 95% 乙醇室温固定 30 min。加 0.3% TritonX-100 室温 10 min; PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 正常

* 基金项目: 国家卫生部课题资助项目(WKJ2007-3-001)。 Δ 通讯作者。

山羊血清 37 °C 封闭 10 min, 吸去不洗; 加兔抗人单克隆抗体 Eag1 (1 : 100), 4 °C 孵育; PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 加羊抗兔 IgG -FITC (1 : 100), 37 °C 孵育 2 h; PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 荧光显微镜观察照相。

1.3.3 判断标准 Eag1 主要定位于胞浆和(或)胞膜。根据肿瘤细胞显色的比例及染色强度, 对 Eag1 表达作半定量评定^[3]。按阳性细胞率评分: 阳性细胞数小于 11% 为 1 分; 11%~50% 为 2 分; 51%~80% 为 3 分; 大于 80% 为 4 分。按显色程度评分: 染色弱为 1 分; 中等染色为 2 分; 强染色为 3 分。然后将 2 种评分结合起来分为 4 级: 无论染色强度如何, 细胞阳性率小于或等于 10% 为阴性; 评 2~3 分者为弱阳性 (+); 评 4~5 分者为中度阳性 (++) ; 6~7 分者为强阳性 (+++)。若 1 例标本有 2 个染色结果, 则取 1 个纳入统计。

1.4 RT-PCR 法检测 Eag1 mRNA 表达 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。Eag1 引物为: 5'-TAA TGG CTT CCC TCT TTC ATC TCC T-3'; 5'-TGT TGA GAC TCC TCC ATT CCT TCC A-3' (450 bp); β -actin 引物为: 5'-CAC GGC TGC TTC CAG CTC CT-3'; 5'-CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT C-3' (150 bp)。取 (0.5~1) × 10⁷ 细胞, 按 Tripil 试剂盒说明提取总 RNA, 按反转录试剂盒说明进行逆转录反应, Eag1 mRNA 的 PCR 反应条件为 94 °C 变性 30 s, 58 °C Eag1 退火 30 s, 72 °C 2 min, 最后 72 °C 延伸 2 min。琼脂糖电泳测定 Eag1 mRNA 表达, 拍照。每一组检测 6 瓶细胞。

1.5 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0 统计软件对结果进行处理, 采用 χ^2 检验, Fisher 确切概率法计算 P 值; 采用单因素方差分析, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Eag1 蛋白在不同宫颈病变中的表达

2.1.1 Eag1 在慢性宫颈炎、CIN 及宫颈鳞癌中的表达 Eag1 在 3 种组织中均为细胞浆、胞膜表达, 细胞核未见表达。Eag1 在慢性宫颈炎及 CIN 中呈轻度着色, Eag1 在宫颈鳞癌中呈中强度着色, 阳性信号弥漫分布于癌巢内 (插页 I 图 1~3)。Eag1 在宫颈鳞癌中的表达率明显高于慢性宫颈炎组和 CIN 组, CIN 组内 Eag1 表达率明显高于慢性宫颈炎组, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 结果见表 1。

2.1.2 Eag1 在各级 CIN 中的表达 Eag1 在 CIN 各级之中的表达随病变程度的增高逐渐增高, 但各组比较无统计学意义 (P > 0.05), 见表 2。

表 1 Eag1 在慢性宫颈炎、CIN 和宫颈癌组织中的表达

组别	n	Eag1 表达			χ^2	P
		+	-	阳性率 (%)		
慢性宫颈炎组	20	1	19	5.00	①	5.637 0.018
CIN 组	40	13	27	32.50	②	13.085 0.000
宫颈鳞癌组	80	52	28	65.00	③	25.048 0.000

①: 慢性宫颈炎组与 CIN 组比较; ②: CIN 组与宫颈鳞癌组比较; ③: 慢性宫颈炎组与宫颈鳞癌组比较。

2.1.3 Eag1 表达与宫颈癌临床病理学指标的关系 Eag1 在不同病理分级中的阳性表达率虽然随病变恶性程度的增高逐

渐增高, 但各组比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。在不同的临床期中, I + II 期组 Eag1 表达明显高于 0 期 (P < 0.01), 而 III + IV 期组 Eag1 表达明显高于 I + II 期组和 0 期组, 差异有统计学意义 (P < 0.01), 结果见表 3。

表 2 Eag1 在各级 CIN 中的表达

组别	n	Eag1 表达			χ^2	P
		+	-	阳性率 (%)		
CIN I	15	4	11	26.67	①	0.033 0.856
CIN II	10	3	7	30.00	②	0.007 0.932
CIN III	15	6	9	40.00	③	0.150 0.699

①: I 与 II 比较; ②: II 与 III 比较; ③: I 与 III 比较。

表 3 Eag1 表达与宫颈癌临床分期、病理分级的关系

组别	n	Eag1 表达			χ^2	P
		+	-	阳性率 (%)		
分期						
G ₁	27	16	11	68.75	①	0.031 0.860
G ₂	26	17	9	65.38	②	0.009 0.925
G ₃	27	19	8	70.37	③	0.325 0.569
分级						
0	26	10	16	38.46	④	4.455 0.035
I + II	30	20	10	66.67	⑤	4.821 0.028
III + IV	24	22	2	91.67	⑥	15.333 0.000

①: G₁ 与 G₂ 组比较; ②: G₂ 与 G₃ 组比较; ③: G₁ 与 G₃ 组比较; ④: 0 与 I + II 组比较; ⑤: I + II 与 III + IV 组比较; ⑥: III + IV 与 I + II 组比较。

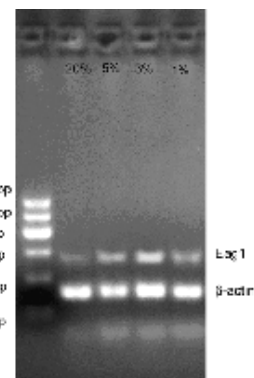


图 5 不同缺氧条件下宫颈癌 HeLa 细胞中 Eag1 mRNA 水平变化

2.2 Eag1 蛋白在 HeLa 细胞的表达 本科选择宫颈癌 HeLa 细胞株, 采用间接免疫荧光法检测细胞内 Eag1 蛋白的表达, 结果发现 Eag1 蛋白主要集中在细胞膜上及胞浆中 (插页 I 图 4)。

2.3 缺氧对 Eag1 mRNA 表达的影响 采用 RT-PCR 法检测了 Eag1 mRNA 在不同缺氧条件下宫颈癌 HeLa 细胞系的表达情况, 给予不同缺氧条件, 3 h 后 HeLa 细胞中其 mRNA 的表达水平不尽相同, 随缺氧程度的增加呈现先增高后降低的趋势 (图 5); 在 5% 氧浓度条件下, 其表达随缺氧时间的增加逐渐增高, 见图 6。

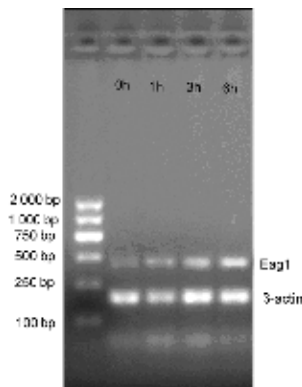


图 6 不同缺氧时间下宫颈癌 HeLa 细胞中 Eag1 mRNA 水平变化

3 讨论

宫颈癌是妇科三大恶性肿瘤之一。研究发现肿瘤内部缺氧不仅可引起肿瘤的发生、发展,还可引起肿瘤细胞化疗抵抗,但其具体的缺氧调控机制仍不十分清楚。最近有关离子通道与低氧适应之间的关系引起了越来越多的注意^[3-4]。离子通道中最常与细胞增殖和肿瘤相关的是钾通道;其中膜 Eag1 钾离子通道被认为与宫颈癌的相关性最为密切。

Eag1 钾离子通道是 1969 年发现的一种新的通道,属电压门控性钾通道,通过去极化而激活。专一分布于大脑,在肌细胞和胎盘中少量表达^[5-6]。Eag 表达和激活在多种肿瘤细胞株和重要的肿瘤组织中被证实。Fatias 等^[7]通过对 6 例宫颈癌组织标本和 12 例正常宫颈组织进行逆转录 PCR 和 Southern 印迹实验,发现 6 例宫颈癌标本 Eag1 表达全部为阳性,而正常对照标本的阳性率仅为 33%。作者认为 Eag1 表达的升高可能是肿瘤发生的早期信号,Eag1 钾离子通道不仅可以作为肿瘤标志物、疾病早期标志,也将成为潜在的宫颈癌治疗靶点。Faris 等^[8]的研究也有相似发现,认为 Eag1 钾离子通道的表达与否及其通道活性大小对癌细胞的增殖非常重要,认为其可能成为潜在的宫颈癌细胞膜上的治疗靶点,但是上述研究均未从 Eag1 的表达情况与宫颈癌临床分期、病理组织类型等方面进行分析,因此,Eag1 与宫颈癌之间的相关性仍需进一步研究。

本研究在应用 FIGO 分期的基础上,采用免疫组化法检测不同宫颈组织中 Eag1 蛋白的表达,结果显示,在 CIN 组织中 Eag1 的表达明显高于慢性宫颈炎组,而宫颈癌组织中 Eag1 的表达又明显高于 CIN 组,Eag1 表达随临床分期升高显著增高,说明在宫颈癌的生长过程中,Eag1 钾离子通道与肿瘤的发生、发展相关。并且随着肿瘤向深层生长,Eag1 表达水平更高,推测肿瘤生长过快,缺氧加重,激活更多的基因表达,更能增加它在胞内的水平。本实验结果显示,Eag1 的表达水平随病理分级的升高而升高,但各组间比较差异无统计学意义。分析其原因,考虑为不同病理分级的肿瘤组织中均有不同程度的低氧区域所致。本研究的间接免疫荧光结果也显示,在正常培养的 HeLa 细胞内可以检测到明显的绿色荧光,证明其中有 Eag1 蛋白表达。

随着对 Eag1 结构和功能的深入研究,发现 Eag1 通道形成的四聚体中,每一个单体有 6 个假定的主要包含电压传感蛋白的跨膜区(富含正电荷氨基酸)^[9],并且它的细胞内侧端有一

个 PAS 区即为氧感受器,它可根据氧分压 PO_2 的变化调节自身电导系数,推测其与肿瘤缺氧有关^[10]。

采用 RT-PCR 法检测不同氧浓度下 HeLa 细胞内 Eag1 mRNA 水平情况,结果显示随氧浓度的降低,Eag1 mRNA 水平呈先升高后降低的趋势,轻度缺氧条件下,缺氧作用 0.5 h 时细胞内 Eag1 mRNA 水平即开始升高,3 h 后达高峰,6 h 后尽管有所减弱,但仍强于常氧条件下,提示随缺氧程度加深及时间的延长,Eag1 mRNA 水平明显增强。

参考文献:

- [1] Camacho J, Saánchez A, Pardo LA, et al. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels[J]. Pflugers Arch, 2000, 441(2):167.
- [2] Wang G, Jiang B, Rue E, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix loop helix PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(12):5510.
- [3] Clifford SC, Astuti D, Hooper L, et al. The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1 alpha in renal cell carcinoma[J]. Oncogene, 2001, 20(36):50672.
- [4] Kung A, Zabludoff S, France D, et al. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway[J]. Cancer Cell, 2004, 6(1):33.
- [5] Swinson DE, Jones JL, Cox G, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways[J]. Int J Cancer, 2004, 111(1):43.
- [6] Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1[J]. Circ Res, 2003, 11(93):1074.
- [7] Fatias L, Deysi B, Lorenza D, et al. Ether a' go-go potassium channels as human cervical cancer markers[J]. Cancer Res, 2004, 64(1):6996.
- [8] Faris L, Ocana D, Diaz L, et al. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours[J]. Mol Cancer, 2006, 5(19):596.
- [9] Zhong H, Semenza GL, Simons JW, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is an early event in prostate carcinoma[J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(2):88.
- [10] Karni R, Dor Y, Keshet E, et al. Activated pp60c-src leads to elevated hypoxia-inducible factor(HIF)-1alpha expression under normoxia[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45):42919.